Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Graumann

Zelluläre Speicherung von Carboxymethylcellulose

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Phagocyten im Nebennierenmark des Goldhamsters

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Horst Eisold
aus Arnsberg

1969

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Graumann

Zelluläre Speicherung von Carboxymethylcellulose

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Phagocyten im Nebennierenmark des Goldhamsters

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Horst Eisold
aus Arnsberg

1969

Dekan: Professor Dr. med. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Arnold

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. F. Lembeck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	4
I. Anlage der Tierversuche	4
II. Methoden	6
A. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	6
B. Lichtmikroskopische Untersuchungen	8
Befunde	9
I. Lichtmikroskopische Befunde	9
II. Elektronenmikroskopische Befunde	11
Diskussion	23
Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis	37

EINLEITUNG

Eine elementare Eigenschaft der Zelle ist die Fähigkeit zur Speicherung. Dadurch können sowohl physiologische Substanzen, wie z.B. Lipide und Kohlenhydrate als Reservematerialien des Stoffwechsels aufgenommen, als auch gewisse unphysiologische Agentien durch Inkorporation in Zellen aus dem aktuellen Stoffwechsel des Organismus herausgenommen werden.

Die Fähigkeit der Speicherung wird besonders deutlich, wenn unter pathologischen Bedingungen eine vermehrte Aufnahme von Material durch die Zelle erfolgt. Dabei ist zunächst die Qualität des Materials unbedeutend, d.h. ob eine physiologischerweise schon im Organismus vorhandene oder eine körperfremde Substanz zur Aufnahme kommt. Für eine geordnete Zellfunktion darf aber offensichtlich die aufgenommene Menge eine gewisse Grenze nicht überschreiten. So ist bei der Glykogenspeicherkrankheit (Thesaurosis glykogenica) der gesamte Organismus in Mitleidenschaft gezogen, weil aufgrund eines Enzymdefektes die Speicherung von Glykogen in verschiedenen Organen in einem exzessiven Maß stattfindet.

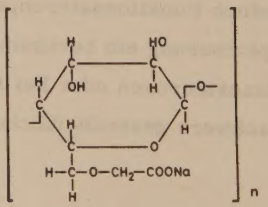
Für die Aufnahme und damit ganz allgemein für die Abwehr körperfremder Materialien steht dem Organismus in Form des Retikulohistiozytären Systems (RHS) ein hochspezialisierter Apparat zur Verfügung. Auch die Zellen dieses Organsystems zeigen jedoch Funktionsstörungen, die bis zum Untergang führen können, wenn die Speicherung ein bestimmtes Ausmaß überschreitet. Das ist etwa der Fall bei Hämosiderosen oder bei Pneumokoniosen, bei denen als Folge der Speicherung schwere gesundheitliche Dauerschäden auftreten können.

Für die praktische Medizin ist auch die Möglichkeit bedeutsam, daß bei der

parenteralen Zufuhr von Arzneimitteln Speicherungsvorgänge auftreten können. So wird Polyvinylpyrrolidon, ein synthetisches Polymer, das als Plasmaersatzmittel verwendet wird, teilweise im RHS gespeichert, da es vom Organismus nicht vollständig abgebaut werden kann.

Ähnlich verhält sich Carboxymethylcellulose (CMC) bei parenteraler Zufuhr. CMC wird in verschiedenen Medikamenten als Trägersubstanz verwendet, so u.a. in den Laxantien Cellolax^{R} und Pasivon^{R}, in dem Antacidum Mazur A^{R}, in den Röntgenkontrastmitteln Falitrast^{R} und Joduron^{R} und auch in anderen Arzneimittelspezialitäten (HEDAYATY und SHUMAN 1953, WELSH 1953, WILJASALO und RISSANEN 1966). Früher wurde CMC in größerem Umfang auch als Basis von ACTH-Präparaten mit Depot-Effekt verwandt (ACTH-Frederiksberg mit Depoteffekt^{R} und Depot-Acetrophan-Hoechst^{R}), während es heute offensichtlich nur noch in einem ACTH-Präparat, dem Acortan-Prolongatum^{R} (Ferring Arzneimittel GmbH) Verwendung findet.

CMC ist eine chemisch indiffenrente Substanz, die sich in Wasser kolloidal löst (HUEPER 1942, JUNG und BRIZIARELLI 1954, GSTIRNER 1960, RÖMPP 1966). Sie kann als Derivat einer Glykolsäure aufgefaßt werden (COOH-CH_2-OH), bei der das H-Atom der Hydroxylgruppe durch den Sechsring der Glucose ersetzt ist. Jeweils 50-600 solcher Sechsringe sind zu einem kolloidalen Riesenmolekül polymerisiert (siehe folgendes Formelschema).



n = 50 - 600

Durch Enzyme wird CMC nicht angegriffen. Darin ist zumindest einer der Gründe für die Veränderungen zu sehen, die es im Organismus ebenso wie andere makromolekulare Verbindungen, z. B. Gelatine, Seidenfibrin, Glykoproteide, Lipoproteide, Pektin, Cellulose, Methylcellulose, ect. (HUEPER 1942 und 1945, HÓRVÁTH, KOVÁCS und BENKÖ 1957, GAREAU und JASMIN 1966) hervorruft.

Eine Speicherung in den Zellen des RHS wurde nach parenteraler CMC-Zufuhr von HUEPER (1942 und 1945), JUNG und BRIZIARELLI (1954), SELYE (1955) und GRAUMANN (1956 c und 1957 a und b) beschrieben.

Bei Versuchstieren wurden außerdem Veränderungen der Zusammensetzung und der Eigenschaften des Blutes beobachtet (BRICK 1952) und als "makromolekulares hämatologisches Syndrom" bezeichnet (HUEPER 1942). Außerdem können Gefäßveränderungen im Sinne einer Atheromatose (HUEPER 1945; BENKÖ, BALAŹC, FRÖHLICH, HÓRVÁTH, KOVAĆS, FELKAI und RÁK 1959; STEHBENS, PHIL und SILVER 1966), Hepatosplenomegalie (TEOH 1961; CUCCURULLO 1964; MACHADO, BISMARCK, LOZZIO und VIRGILIO 1966) und Nierenschädigungen, die Ähnlichkeit mit Veränderungen bei der membranösen Glomerulonephritis besitzen (NOVELLO und WESSEL 1963; CUCCURULLO und COVELLI 1964; IACOBELLI, CUCCURULLO, ANDREOLI und CAPORALE 1963) hervorgerufen werden.

Bei Verwendung von Depot-ACTH-Präparaten waren die Speicherzellen des Nebennierenmarks in starkem Maße an der Speicherung von CMC beteiligt und zeigten deutliche Zeichen der Zellschädigung (GRAUMANN 1957 b; v. JÜRGENSONN 1965). Wurde Goldhamstern in Langzeitversuchen eine Woche lang täglich 1ml einer 1%igen Lösung von CMC injiziert und die so vorbehandelten Tiere 24 Stunden, 1 Woche, 2 und 3 Wochen nach der letzten Injektion getötet, so zeigte sich, daß in allen Stadien eine Speicherung nachzuweisen war. Das Maximum der Speicherung befand sich bei den Tieren, die eine Woche nach der letzten Injektion getötet worden waren (v. JÜRGENSONN 1965).

Bei diesen lichtmikroskopischen Studien konnte aus methodischen Gründen die Frage des Inkorporationsmodus in die Zelle nicht untersucht werden. Ebensowenig konnte geklärt werden, welche Zellorganellen am Speichervorgang beteiligt sind und als Folge der Speicherung geschädigt werden.

Diesen Aspekt der CMC-Speicherung näher zu beleuchten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, deren methodische Einzelheiten hinsichtlich Applikationsmodus, Tierart und Tötungstermine der Tiere den entsprechenden Versuchen in den lichtmikroskopischen Untersuchungen von GRAUMANN (1956 c; 1957 a und b) und v. JÜRGENSONN (1965) entsprechen.

MATERIAL UND METHODEN

I.) ANLAGE DER TIERVERSUCHE

Als Versuchstiere dienten Goldhamster (Mesocricetus auratus) aus institutseigener Zucht. Es wurden erwachsene männliche und weibliche Tiere mit einem Lebendgewicht von 80-100g verwendet. Zur Gewinnung der Nebennieren wurden die Tiere durch Inhalation von Leuchtgas getötet und die Nebennieren lebensfrisch entnommen und fixiert.

Versuchsserie a:

Elf Hamstern wurde an sechs aufeinanderfolgenden Tagen um dieselbe Tageszeit jeweils 1,0ml einer 1%igen Lösung von CMC ("Natrium-Carboxymethylcellulose" FLUKA) in physiologischer Kochsalzlösung abwechselnd rechts und links der Wirbelsäule subcutan injiziert. Die Gesamt-

dosis betrug somit 60mg CMC pro Tier. Als Kontrollen dienten zwei Tiere, denen physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde, und zwar zu gleichen Zeiten und in gleichen Mengen.

Tötungstermine: Zwei Hamster 24 Stunden nach der letzten Injektion, sieben Hamster nach einer Woche, darunter die zwei Kontrolltiere, je zwei Hamster zwei und drei Wochen nach der letzten Injektion.

Versuchsserie b:

Vier Hamstern wurde an sechs aufeinanderfolgenden Tagen um dieselbe Tageszeit jeweils 1,0ml einer 1%igen Lösung von CMC in physiologischer Kochsalzlösung, wie oben beschrieben, injiziert (Gesamtdosis 60mg CMC pro Tier). Alle vier Tiere wurden eine Woche nach der letzten Injektion getötet.

Versuchsserie c:

Drei Hamstern wurden einmal 4ml einer 1%igen Lösung von CMC in physiologischer Kochsalzlösung subcutan injiziert (Gesamtdosis 40mg CMC pro Tier). Je ein Tier wurde 12 Stunden, drei Tage und sechs Tage nach der Injektion getötet.

Versuchsserie d:

Zwei Tieren wurden einmal 6ml 1%ige CMC (Gesamtdosis 60mg CMC pro Tier) injiziert. Die beiden Tiere wurden fünf Tage nach der Injektion getötet.

II. METHODEN

Bei der Versuchsserie a wurde je eine Nebenniere eines Tieres zur elektronenmikroskopischen Untersuchung und eine zur lichtmikroskopischen verarbeitet.

A. Elektronenmikroskopische Untersuchungen:

Die Nebennieren wurden 12 Stunden in kaltem gepuffertem 6,25%igen Glutardialdehyd fixiert (SABATINI, BENSCH und BARRNETT 1963). Nach mehrstündigem Spülen in 0,1 M Phosphatpuffer von p_H 7,2, wurden unter einem Stereo-Auflichtmikroskop mit einer Rasierklinge Rinde und Mark voneinander getrennt. Darauffolgend wurde zwei bis vier Stunden in 1%igem OsO_4, in 0,1 M Phosphatpuffer von p_H 7,2 (MILLONING 1961) nachfixiert.

Eine Nebenniere der Serie a wurde nicht in OsO_4 nachfixiert. Die Nebennieren wurden nach erneutem Spülen in Puffer stufenweise in Aceton entwässert und in Vestopal W eingebettet (KELLENBERGER, SCHWAB und RYTER 1956):

30%iges Aceton	30 Minuten
50%iges Aceton	30 Minuten
70%iges Aceton	30 Minuten
90%iges Aceton	30 Minuten
100%iges Aceton	3 x 30 Minuten
Vestopal : Aceton = 1 : 3	24 Stunden
Vestopal : Aceton = 1 : 1	24 Stunden
Vestopal : Aceton = 3 : 1	48 Stunden
reines Vestopal + Initiator + Beschleuniger	48 Stunden
Polymerisation bei 50°C	24 Stunden

Mit dem Reichert Ultramikrotom Typ "Om U2" wurden Ultradünnschnitte angefertigt, die silberne bis goldene Interferenzfarben zeigten. Die auf mit Formvarfolien überzogenen Kupfernetzen aufgefangen und mit Bleihydroxyd (KARNOWSKY 1961) nachkontrastierten Schnitte wurden mit dem Zeiss Elektronenmikroskop EM 9 untersucht.

Alle Nebennieren der Versuchsserie b wurden nach Fixierung in Glutardialdehyd bis zur Refixierung in OsO_4 gleich behandelt wie die der Serie a. Dann wurde unterschiedlich vorgegangen:

(A)	(B)	(C)
Inkubation in essigsaurer koll. Eisenlösung, 2h (GRAUMANN 1958)	Inkubation in 1% koll. Thorium in 30%iger Essigsäure, 2 bzw. 5h (REVEL 1966)	Inkubation in 0,3%iger $FeCl_3$-Lösung, 5h (WETZEL 1966)
Spülen in 5%igerEssigsäure, 2mal 5 min.	Spülen in 30%iger Essigsäure, 2mal 5 min.	Spülen in dest. Wasser
Entwässern	Entwässern	Entwässern
Einbetten in Vestopal	Einbetten in Vestopal	Einbetten in Vestopal

Zu (A): Die essigsaure kolloidale Eisenlösung wurde nach den Angaben von GRAUMANN und CLAUSS (1958) hergestellt.

Zu (B): Das kolloidale Thorium wurde nach den Angaben von VANINO (1921) unter Anwendung geringer Modifikationen folgendermaßen hergestellt:

20mg Thorium werden in Wasser gelöst, die Lösung mit NaOH gefällt. Der Niederschlag wird durch wiederholtes Waschen in der Zentrifuge von verunreinigenden Elektrolyten befreit, mit wenig Wasser in einen Kolben gespült und unter dauerndem Umschütteln zum Sieden erhitzt. Inzwischen löst man weitere 10g Thoriumnitrat in 50ml Wasser und fügt nun aus einer Bürette kleine Portionen, anfangs je 1ml dieser Lösung dem Thoriumhydroxyd zu, indem man nach dem Zusatz jeder neuen Menge 5 Minuten lang kocht. Hat man etwa 9,5ml verbraucht, so verschwinden beim Kochen die Klumpen des Niederschlags und bei weiteren Zusätzen nimmt die Flüssigkeit ein milchiges Aussehen an; wenn ca. 10,5 bis 11,5ml verbraucht wurden, klärt sich die Flüssigkeit und behält nur ein schwach opaleszierendes Aussehen. Das so entstandene homogene Hydrosol ist mehrere Monate haltbar. Wird es unbrauchbar, so erkennt man die Unbrauchbarkeit am Ausflocken des Materials.

Die Nebennieren der Versuchsserie c wurden wie die der Serie a behandelt, d.h. je eine Nebenniere eines Tieres wurde für die Lichtmikroskopie, die

andere für die Elektronenmikroskopie aufbereitet.

Bei den Nebennieren der Versuchsserie d, wurde die eine für die Lichtmikroskopie verwendet, die andere nach folgendem Schema behandelt:

1) Fixierung in 6,25%igem Glutardialdehyd bei 4°C für 12 Stunden

2) Ausspülen in 0,1 M Phosphatpuffer p_H 7.2 für 12 - 24 Stunden

3) Anfertigen von 75µm dicken Gewebsscheiben mittels tissue sectioner (Firma Sorvall, Typ TC 2)

4) Die so gewonnenen Gewebsscheiben 2 Stunden bei Zimmertemperatur in essigsaurem kolloidalem Eisen inkubieren

5) 2 x 5 min spülen in 5%iger Essigsäure

6) Nachfixieren in 1%igem OsO_4 für 2 - 4 Stunden.

a.)	b.)
Aufsteigende Alkoholreihe und Einbetten in Paraplast	Aufsteigende Acetonreihe und Einbetten in Vestopal
Herstellung 6-7µm dicker Schnitte	Herstellung silbern bis gold glänzender Schnitte mit dem Ultramikrotom
Turnbullblaureaktion und Betrachtung im Lichtmikroskop	Betrachtung im Elektronenmikroskop

B. Lichtmikroskopische Untersuchungen:

Die Nebennieren wurden nach folgendem Schema behandelt:

1) Fixierung in Carnoyschem Gemisch bei 4°C für 2 Stunden (ROMEIS 1948; § 226)

2) Abs. Alkohol von 4°C für 30 Minuten

3) Abs. Alkohol, 30 Minuten. Allmählicher Übergang von 4°C auf Zimmertemperatur

4) Abs. Alkohol, 30 Minuten bei Zimmertemperatur.

Übliche Einbettung über Methylbenzoat in Paraplast und Anfertigung von 7-8µm dicken Schnitten, an denen folgende Reaktionen ausgeführt werden:

1) Polysaccharid-Eisenreaktion nach GRAUMANN und CLAUSS (1958). Modifizierte Kerndarstellung mit Kernechtrot (ROMEIS 1948; § 743).

2) Aldehydfuchsinfärbung ohne Voroxydation (GRAUMANN 1956 b, 1957 a und b). Für mikrofotografische Zwecke wurde eine Voroxydation vorgenommen.

3) Perjodat-Leukofuchsinreaktion in der Modifikation von GRAUMANN (1953).

Eine kritische Darstellung der Methoden zum lichtmikroskopischen Nachweis der CMC findet sich bei SCHNABEL (1959) und von JÜRGENSONN (1965).

BEFUNDE

I. Lichtmikroskopische Befunde

Die injizierte CMC läßt sich histochemisch in allen Stadien deutlich nachweisen. 24 Stunden nach einer einmaligen Injektion von 4ml CMC findet man das Material im wesentlichen diffus zwischen den Zellen der Zona reticularis und in den Kapillaren, während es nur vereinzelt in Speicherzellen nachzu-

Abb. 1 Ausschnitt aus einer Nebenniere. Eisenbindungsreaktion/Kernechtrot. 24 Stunden nach einer einmaligen Injektion von 4ml CMC. K = Organkapsel, R = Rinde, F = Zona fasciculata, G = interstitiell und intrakapillär gespeicherte Substanz vor allem in der Zona reticularis, M = Mark. Hauptmenge des Speichermaterials noch extrazellulär.

weisen ist (Abb. 1). In späteren Stadien verschwindet die interstitiell und intrakapillär gelagerte CMC und wird dann nur noch in Speicherzellen gefunden.

Eine Übersicht über die Anzahl der speichernden Zellen und ihre topographische Verteilung in den verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde und des Markes gibt die Eisenbindungsreaktion (Abb. 2).

Bei der Nebennierenrinde ist zu erkennen, daß Speicherzellen in der Zona glomerulosa dicht unter der Kapsel, aber auch in der Kapsel selbst liegen. In der Zona fasciculata finden sich nur vereinzelte Speicherzellen, während sich die größte Anzahl der Zellen in der Zona reticularis befindet.

Das Nebennierenmark weist einen follikulären Bau auf, und die Speicherzellen liegen hier sowohl inter- als auch intrafollikulär. Speicherzellen des Marks unterscheiden sich morphologisch nicht von denen der Rinde. Das Speichermaterial ist immer in scholliger Form im Cytoplasma verteilt (Abb. 3), die Zellkerne sind meist pyknotisch, und häufig ist eine Kernprotrusion sichtbar.

II. Elektronenmikroskopische Befunde

Versuchsserie a:

Injektion von täglich je 1ml 1%iger CMC an sechs aufeinanderfolgenden Tagen (insgesamt 60mg CMC pro Tier). Tötung der Tiere 24 Stunden, 1 Woche, 2 und 3 Wochen nach der letzten Injektion.

CMC läßt sich in allen untersuchten Stadien als fädigvernetztes Material in Speicherzellen nachweisen und erlaubt so eindeutig deren Identifizeirung.

Die äußere Form der Speicherzellen wird von den umgebenden Parenchymzellen bestimmt und ist im allgemeinen länglich-oval. Einzelne Zellen be-

Abb. 2 Ausschnitt aus einer Nebenniere. Eisenbindungsreaktion/Kernechtrot. Eine Woche nach Injektion von insgesamt 60mg CMC. Speicherzellen vor allem in der Zona reticularis, im Mark, in der Organkapsel sowie der Zona glomerulosa. Zona fasciculata von Speicherzellen fast ganz frei.

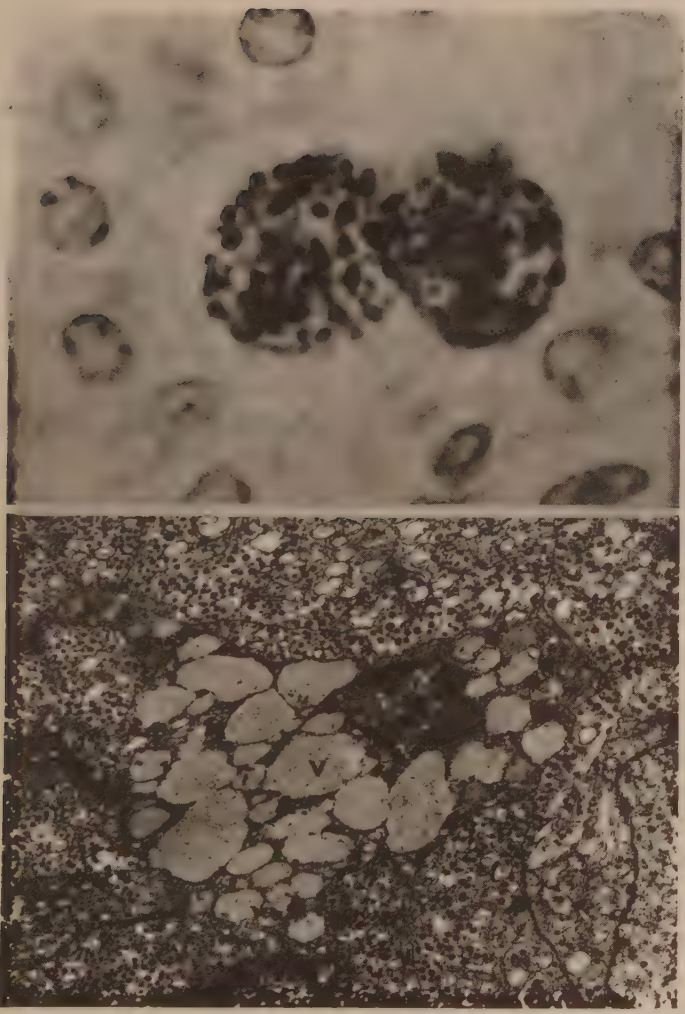


Abb. 3 Zwei Speicherzellen im Nebennierenmark. Aldehydfuchsinfärbung mit Voroxydation. Eine Woche nach Injektion von insgesamt 60mg CMC. Schollige Verteilung des Speichermaterials.

Abb. 4 Elektronenoptische Übersichtsaufnahme einer einzelnen Speicherzelle im Nebennierenmark. 3 Wochen nach Injektion von insgesamt 60mg CMC. Maßstab: 7200 : 1. A = zipfelförmige Zellausläufer, V = Speichervakuolen.

sitzen kurze, zipfelförmige Fortsätze, die sich zwischen die umgebenden Parenchymzellen schieben (Abb. 4). In den Zellen fallen große Vakuolen auf, die fast das gesamte Cytoplasma der Zellen einnehmen. Die Vakuolen sind rundlich, länglich oder polycyklisch begrenzt. Sie liegen entweder isoliert oder konfluieren zu größeren Aggregaten, wobei die Verschmelzungsflächen unterschiedlich groß sind. Bei starker Speicherung besteht nahezu die ganze Zelle aus einer großen, polycyklischen Vakuole, und man erkennt in den Zwischenräumen nur noch Reste von Membranen, Mitochondrien und anderen Zellorganellen (Abb. 5). Die Vakuolen sind von Doppelmembranen umgeben, deren Erhaltungszustand nicht immer gleich gut ist, so daß neben Abschnitten, in denen die Einzelmembranen streng parallel angeordnet sind, solche vorkommen, in denen sie auseinanderweichen oder völlig fehlen. Hier geht der Inhalt der Vakuolen in das umgebende Cytoplasma über.

Der Inhalt der Vakuolen besteht aus kontrastarmem netzartig angeordnetem Material, das in unterschiedlicher Menge in den einzelnen Vakuolen vorliegt, wodurch die Vakuolen verschieden kontrastreich erscheinen. Obwohl vorzugsweise kleinere Vakuolen kontrastreich sind, besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Größe der Vakuolen und der Elektronendichte des Inhaltes. Selten findet man in großen Vakuolen mit allgemein geringer Dichte kleine Bezirke stärkeren Kontrastes.

Die Kerne liegen am Rand der Speicherzellen und scheinen oft gerade ausgestoßen zu werden (Abb. 5). Sie weisen stets deutliche Merkmale des Untergangs auf. So ist das Chromatin häufig entmischt und an den Rand der Kerne verdrängt, oder der Kern ist durch entsprechende Speichervakuolen deformiert. Die Kernmembran fehlt teilweise, so daß

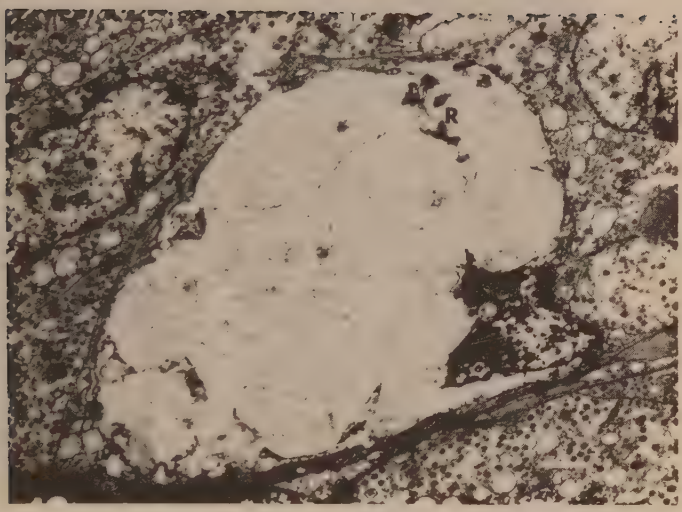


Abb. 5 Einzelne Speicherzelle im Nebennierenmark. Zwei Wochen nach Injektion von insgesamt 60mg CMC. Maßstab: 7200 : 1. Sämtliche Speichervakuolen sind konfluiert, Zellorganellen bis auf geringe Reste (R) aufgelöst. Der an die Peripherie gedrängte Zellkern wird ausgestoßen.

in solchen Bereichen das Karyoplasma ohne Grenze in das Cytoplasma übergeht. Nucleolen sind nicht zu erkennen.

In den Speicherzellen sind nur wenige Mitochondrien vorhanden. Sie zeigen in ihrem Inneren, wie die umgebenden Parenchymzellen Cristae

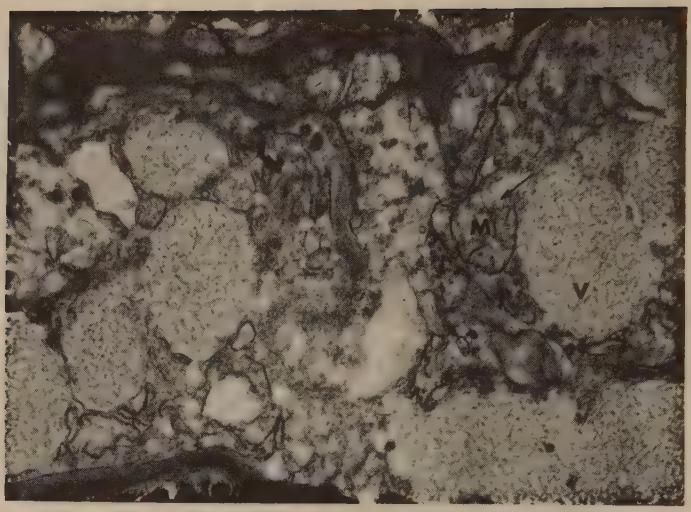


Abb. 6 Ausschnitt aus Speicherzelle. Drei Wochen nach Injektion von 60mg CMC. Maßstab: 64000 : 1. Zahlreiche Vakuolen, von in Auflösung begriffenen Membranen umgeben. V = Vakuole mit Speichermaterial, M = Mitochondrium. An der Stelle des Pfeils sind Mitochondrium und Vakuole aufgebrochen und Speichermaterial tritt in das Mitochondrium ein.

mitochondriales, die jedoch meist nur schlecht erhalten sind und dann als undeutliche Fragmente vorliegen. Auch die umgebenden Doppelmembranen sind häufig unvollständig, so daß sich Verbindungen der Mitochondrienmatrix zu den Vakuolen und zum Cytoplasma ergeben (Abb. 6 und 7). In den Mitochondrien findet sich in diesen Fällen zuweilen ein

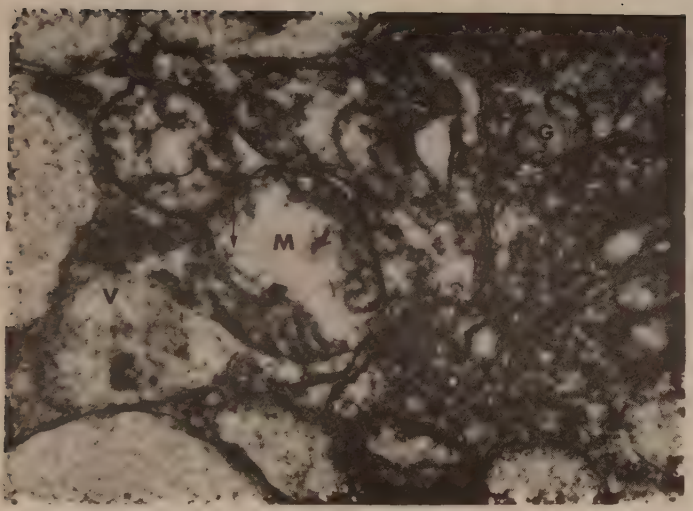


Abb. 7 Abschnitt aus Speicherzelle. Drei Wochen nach Injektion von 60mg CMC. Maßstab: 115000 : 1, G = Golgikomplex, V = Vakuole mit Speichermaterial, M = Mitochondrium. An der Stelle des Pfeils sind Vakuole und Mitochondrium aufgebrochen und Speichermaterial tritt in das Mitochondrium über.

Material, das dieselbe Struktur aufweist, wie das im Inneren der Vakuolen.

Ein Endoplasmatisches Retikulum (ER) ist nicht in allen untersuchten Speicherzellen nachzuweisen, insbesondere ist aber kein paralleler Verlauf der dem ER zugehörigen Membranen über eine größere Strecke hin zu beobachten.

Ebenso ist auch nur in wenigen Speicherzellen ein gut ausgebildeter Golgikomplex zu finden, der dann entweder im peripheren Cytoplasma, und zwar außerhalb des Bereiches der Speichervakuolen, oder aber, zusammen mit Mitochondrien im Zentrum der Zellen, nicht jedoch verteilt zwischen den Vakuolen liegt (Abb. 7).

An ungewöhnlichen Strukturen finden sich im Cytoplasma spiral- bzw. rosettenförmige osmiophile Strukturen. Sie werden von unterschiedlich breiten Lamellen aufgebaut, deren lockere Anordnung durch eine interlamilläre kontrastarme, homogene Matrix zustande kommt (Abb. 8). Bei hoher Auflösung ist der Aufbau der Lamellen aus Doppelt- bzw. Dreifachmembranen zu erkennen (Abb. 9). Diese Spiralkörperchen fehlen in einigen Zellen völlig, während sie in anderen häufig und dicht nebeneinander anzutreffen sind, ohne daß eine bevorzugte topographische Beziehung zu bestimmten Zellorganellen erkennbar würde. Sie finden sich vor allem in solchen Speicherzellen, die starke Verfallserscheinungen zeigen, und bei denen die Vakuolenmembranen nur noch stellenweise erhalten sind.

Die Struktur des Vakuoleninhaltes ist in nur mit Glutardialdehyd fixierten Organen sehr viel schlechter zu erkennen als nach OsO_4-Fixierung.

Im Nebennierenmark der Kontrolltiere finden sich keine Speicherzellen.

Versuchsserie b:

Injektion von täglich je 1ml 1%iger CMC an sechs aufeinanderfolgenden Tagen (insgesamt 60mg CMC pro Tier). Tötung der Tiere eine Woche nach der letzten Injektion. Inkubation des Nebennierenmarks in kolloidalem Eisen, kolloidalem Thorium oder $FeCl_3$.

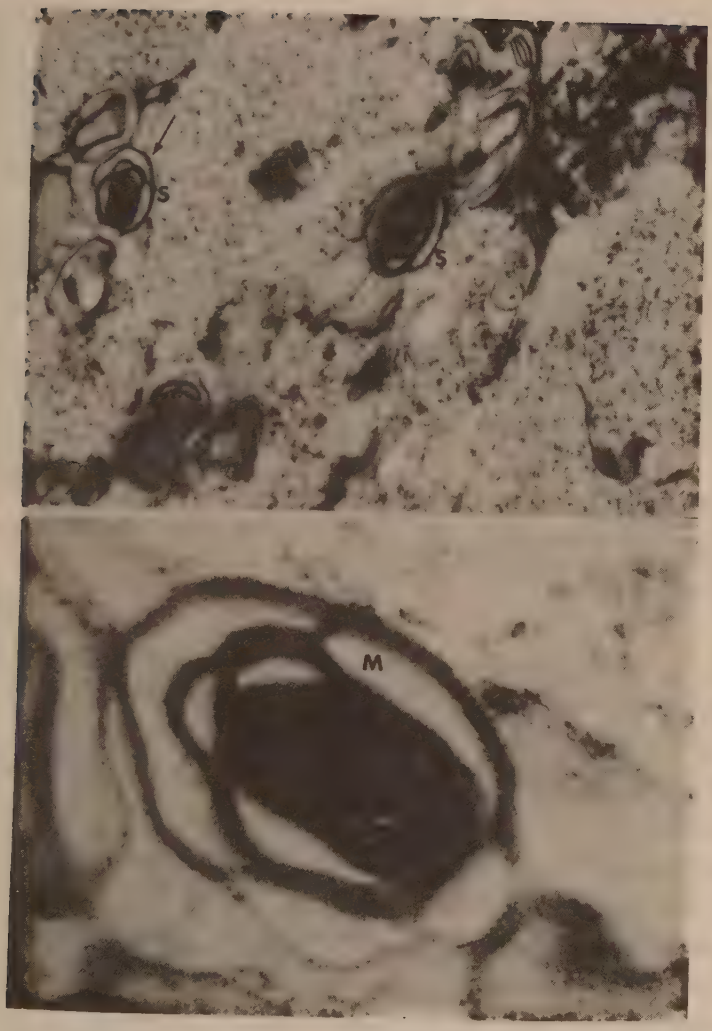


Abb. 8 Ausschnitt aus Speicherzelle. Eine Woche nach Injektion von 60mg CMC. Maßstab: 54000 : 1. Zahlreiche "Spiralkörperchen", aus Lamellen aufgebaut. Schlechter Erhaltungszustand der Zelle. Das mit dem Pfeil gekennzeichnete Spiralkörperchen ist in Abb. 9 bei stärkerer Auflösung dargestellt.

Abb. 9 Maßstab : 252000 : 1. Aufbau der osmiophilen Lamellen aus Doppelt- bzw. Dreifachmembranen. M = Matrix, elektronenoptisch leer und homogen.

Der morphologische Erhaltungszustand der Zellen ist in allen Präparaten dieser Serie schlechter als in der vorherigen. Die Zellen zeigen regelrechte Auflösungserscheinungen, wie stellenweises Fehlen des Plasmalemm und der Vakuolenmembranen, während Mitochondrien und Golgikomplex überhaupt nicht mehr zu erkennen sind. Der Vakuoleninhalt ist entmischt, so daß neben Bereichen mit stärkerer Materialansammlung elektronenoptisch leere Abschnitte vorliegen. In den mit kolloidalem Eisen, Eisenchlorid, bzw. kolloidalem Thorium behandelten Präparaten ist keine Kontrasterhöhung des Vakuoleninhaltes gegenüber unbehandelten Objekten zu erkennen.

Versuchsserie c:

Einmalige Injektion von 4ml 1%iger CMC bei drei Tieren (insgesamt 40mg CMC pro Tier). Tötung der Tiere 24 Stunden, 3 Tage und 6 Tage nach der Injektion.

Schon nach einer einzigen Injektion ist nach 24 Stunden eine Speicherung nachzuweisen, allerdings ist die Anzahl der Speicherzellen deutlich geringer als bei Tötung zu einem späteren Zeitpunkt. Hingegen entspricht das morphologische Bild der Zellen in qualitativer Hinsicht in allen Einzelheiten dem bei Versuchsserie a beschriebenen. Quantitativ bestehen Unterschiede in der Menge des aufgenommenen Speichermaterials, daher scheinen zahlreiche Vakuolen noch leer oder nur mit geringen Mengen Speichermaterial angefüllt. Auf der Außenseite der Speichervakuolen sind teilweise perlschnurartig angeordnete Ribosomen vorhanden. Außerdem lassen sich nicht an Membranen gebundene Ribosomen im Cytoplasma nachweisen (Abb. 10).

Drei bis sechs Tage nach der Injektion liegt das Bild der Speicherzellen wie bei Serie a beschrieben vor.

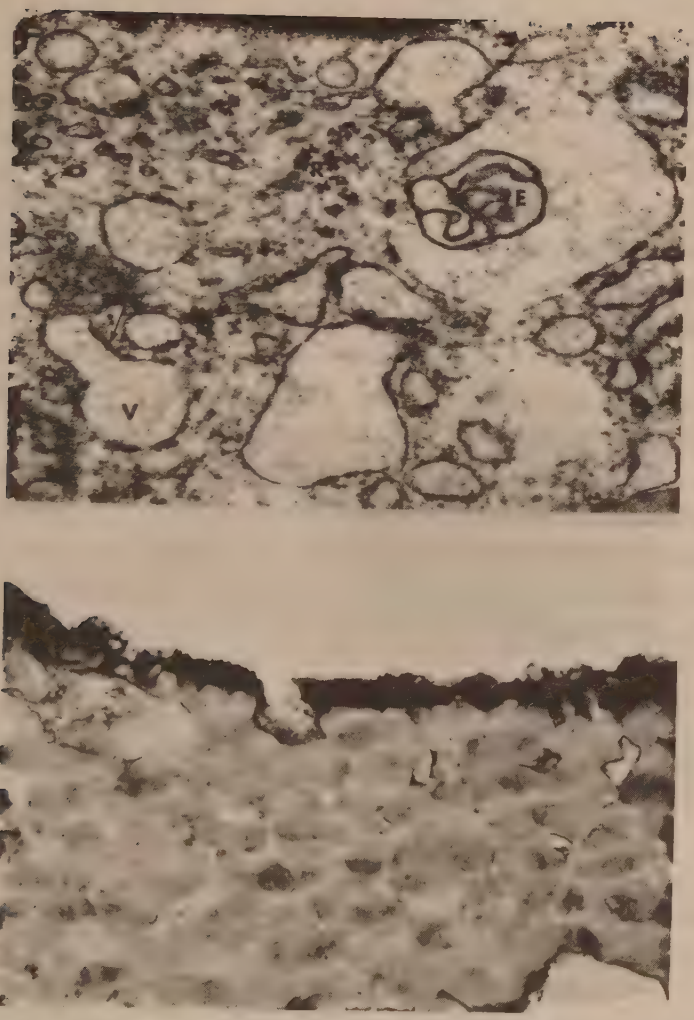


Abb. 10 Ausschnitt aus Speicherzelle. 24 Stunden nach einmaliger Injektion von 4ml CMC. Maßstab: 60000 : 1. Zahlreiche Vakuolen (V), die erst wenig Speichermaterial enthalten. R = frei im Cytoplasma liegende Ribosomen, E = Entmischungsfigur von Myelinlamellen: wahrscheinlich als Vorstufe der Spiralkörperchen aufzufassen.

Abb. 11 Lichtmikroskopische Aufnahme eines Markabschnittes. Inkubation in essigsaurem kolloidalem Eisen für zwei Stunden. Anschließend Turnbullblaureaktion. Eisen nur locker an der Schnittoberfläche aggregiert, jedoch nicht in das Gewebsinnere eingedrungen.

Versuchsserie d:

Einmalige Injektion von 6ml 1%iger CMC bei zwei Tieren (60mg CMC pro Tier). Tötung der Tiere fünf Tage nach der Injektion. Fixierung in Carnoy (1) oder Glutardialdehyd (2).

(1) Diese Nebennieren zeigen nach Durchführung der Eisenbindungsreaktion, der Perjodat-Leukofuchsinreaktion oder der Aldehydfuchsinfärbung das schon beschriebene lichtmikroskopische Bild.

(2) Diese Nebennieren wurden mit kolloidaler Eisenlösung behandelt und das Eisen als Turnbullblau nachgewiesen. Dabei zeigte sich nur am Rande der Präparate ein intensiv blau gefärbter Saum, wohingegen im Inneren des Markes keinerlei Blaufärbung - also Speicherzellen - zu erkennen war. Auch dort, wo Gefäße und Follikellumina direkten Kontakt mit der Inkubationsflüssigkeit hatten, befand sich ein blauer Saum aggregierten Eisens. Der allgemeine Erhaltungszustand des Gewebes war schlecht (Abb. 11).

Im Elektronenmikroskop zeigten die Speicherzellen nach Inkubation in kolloidalem Eisen keine Kontrasterhöhung, jedoch deutliche Zerstörungserscheinungen.

DISKUSSION

Das Nebennierenmark eignet sich für die Untersuchung von Speichervorgängen besonders gut (GRAUMANN 1956 a und b). Schon unter physiologischen Bedingungen sind Speicherzellen darin nachweisbar, und ihre Zahl erhöht sich beim Angebot einer speicherbaren Substanz schlagartig. Als speicherbare Modellsubstanz eignet sich für lichtmikroskopische Untersuchungen CMC, da sie durch die Aldehydfuchsinfärbung und die Perjodat-Lukofuchsinreaktion eindeutig zu identifizieren ist (GRAUMANN 1957 a und b; GRAUMANN und GOTHE 1959).

Da es das Ziel dieser Untersuchung ist, die cytologischen Vorgänge bei der Speicherung von CMC elektronenmikroskopisch zu verfolgen, stellt sich die Frage nach einer spezifischen elektronenmikroskopisch-histochemischen Nachweismethode für CMC. Der Kontrast einer Substanz im Elektronenmikroskop ist von der Ordnungszahl der vorliegenden Elemente abhängig. Da CMC aus den gleichen Elementen aufgebaut ist, wie die meisten biologischen Substanzen, nämlich aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff, ist kein hoher Kontrast der CMC zu erwarten.

Durch Bindung von Metallen an Substanzen mit geringer Massendichte werden bestimmte Gruppen mit Atomen möglichst hoher Kernladungszahl besetzt, so daß eine stärkere Streuung der auftreffenden Elektronen erreicht wird. Durch Inkubation der Gewebe in kolloidalen Metallen werden die sauren Gruppen der Mucopolysaccharide durch Metalle besetzt und dadurch wird überall dort, wo sich Mucopolysaccharide befinden, eine Kontraststeigerung erreicht. Dabei spielen wegen der geringen Elektronegativität der sauren Gruppen heteropolare Ionenbindungen sicherlich nur eine geringere Rolle, und es handelt sich im wesentlichen um eine Aggregation von Metall durch Van-der Waals' sche Kräfte.

Als Metallsole werden kolloidales Eisen oder wegen seiner höheren Massendichte kolloidales Thorium empfohlen (BERLIN 1967; CURRAN, CLARK und LOVELL 1965; MOWRY 1963; REVEL 1964 und 1966; WETZEL, WETZEL und SPICER 1966; YARDLEY und BROWN 1965). Diese Methoden haben aber den Nachteil, daß sie nocht nicht standardisiert sind und deshalb nicht als Routinemethoden verwendet werden können, wie es beispielsweise in der Lichtmikroskopie für die Perjodat-Leukofuchsinreaktion der Fall ist. WETZEL et al. (1966) verwendeten fixierte Kryostatschnitte, die sie in kolloidaler Eisenlösung oder in Eisenchlorid bei einem p_H von 2.0 inkubierten. Dargestellt wurden saure Schleimsubstanzen auf der Oberfläche epithelialer Mikrovilli der Recto-Sigmoidregion, jedoch auch intrazellulär gelegene Schleimsubstanzen, die sich innerhalb der Golgilamellen befanden. BERLIN (1967) behandelte nicht ganze Gewebsblöcke, sondern einzelne Ultradünnschnitte mit einer 1%igen Lösung von Thorotrast. Als Gewebe kam in Methacrylat eingebettetes Ratten- und Schweineileum zur Anwendung. Als Ergebnis fanden sich kontrastreiche Bezirke im Inneren von Golgikomplexen. CURRAN et al. (1965) inkubierten einerseits in der nach MOWRY (1963) hergestellten kolloidalen Eisenlösung 0,5-1 mm dicke Gewebsblöcke, die sie dann einbetteten und weiterverarbeiteten, und andererseits direkt Ultradünnschnitte, die sie auf kolloidalem Eisen flottieren ließen. Sie erhielten eine positive Reaktion im Golgikomplex, wobei die Ergebnisse besser waren, wenn die Inkubation vor der Einbettung in Epon erfolgte. YARDLEY und BROWN (1965) wandten die Methode mit kolloidaler Eisenlösung auf Fibroblastenkulturen an. Sie fixierten die Zellen 30 Minuten in 10%igem Formalin und inkubierten sie dann in kolloidalem Eisen nach MOWRY (1963). Anschließend erfolgte Nachfixierung in 1%iger Osmiumsäurelösung und Einbettung in Araldit. Die Strukturerhaltung der Zellen war wegen des erforderlichen niedrigen p_H-Wertes schlecht. Im Cytoplasma und auch im Zellkern konnte Eisen nachgewiesen werden. Es blieb wegen der

schlechten Zellerhaltung unsicher, ob die vorhandenen Eisenmengen auf das Vorkommen von sauren Mucopolysacchariden bezogen werden konnten.

REVEL (1964) beschreibt, daß wegen der geringen Eindringtiefe des kolloidalen Eisens nur extrazelluläre saure Komponenten dargestellt werden. Nur bei Verwendung von Dünnschnitten sei es möglich, auch innerhalb von Zellen mit kolloidalem Eisen Strukturen nachzuweisen. Da Thorium bei gleicher Ladung und bei gleichen kolloidalen Eigenschaften eine höhere Massendichte als Eisen besitzt, verwendet REVEL auch Thorium zur Darstellung der sauren Mucopolysaccharide. Er findet Thorium vor allem extrazellulär, jedoch auch im Golgiinternum von Chondrocyten.

Bei den eigenen Untersuchungen gelang es in keinem Fall, Eisen oder Thorium im Inneren der Speicherzellen nachzuweisen. Weder im Golgikomplex noch in den Speichervakuolen konnten die Metalle gefunden werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Gewebe vor der Einbettung in Vestopal in kolloidaler Thorium- bzw. Eisenlösung inkubiert wurde, oder ob die Ultradünnschnitte frei flottierend auf den Metallsolen behandelt wurden. Die Ursache für das Nichteindringen der Kolloide in die Ultradünnschnitte ist wahrscheinlich darin zu sehen, daß zur Einbettung Vestopal verwendet wurde, während die anderen Autoren Epon, Methacrylat und Araldit verwendeten. Der Vernetzungsgrad von Vestopal ist offensichtlich so stark, daß das Eindringen der Metallkolloide unmöglich gemacht wird.

Wegen des negativen Ausfalls der Versuche wurden Kontrollpräparate mit eindeutig extrazellulär liegenden Schleimsubstanzen angefertigt. Diese Kontrollpräparate, es kam Rectum zur Anwendung, wurden ebenfalls in kolloidalem Eisen bzw. Thorium inkubiert. Als Ergebnis fanden sich eindeutige Metallniederschläge auf der Oberfläche des Stäbchensaumes und zwischen

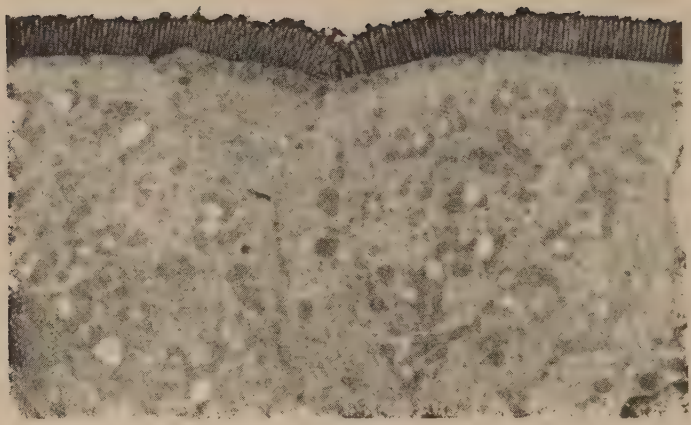


Abb. 12 Rectum. Inkubation in kolloidaler Thoriumlösung für 15 Stunden. Keine Nachkontrastierung in Bleihydroxyd. Deutliche Metallniederschläge extrazellulär, keinerlei Metallniederschläge intrazellulär.

den Mikrovilli. Die Metalle waren jedoch nicht in das Zellinnere eingedrungen. Es existiert eine scharfe Grenze der Metallniederschläge zwischen Zelläußerem und Innenraum. Auch in der Golgizone waren keine Metalle nachweisbar (Abb. 12).

Kolloide sind durch eine Teilchengröße von 100 bis 1000 ÅE definiert. Um echte Lösungen, deren Teilchengröße unter 100 ÅE liegt, von kolloidalen Lösungen zu trennen, verwendet man in der Dialysetechnik Ultrafilter. Die mittlere Porenweite solcher Ultrafilter beträgt 100 ÅE (HOLLEMANN und WIBERG 1964). Da die Zellmembran selbst gewissermaßen einen Ultrafilter darstellt, ist es schon aus theoretischen Erwägungen heraus unwahrscheinlich, daß mit Metallsolen Strukturen des Zellinneren nicht angeschnittener Zellen dargestellt werden können, sofern durch die Fixierung die physikochemischen Eigenschaften des Plasmalemm nicht nennenswert verändert werden. Das scheint bei Glutardialdehydfixierung der Fall zu sein. Hinzu kommt, daß bei dem Fixierungsvorgang eine gewisse unvermeidliche Gewebsschrumpfung auftritt.

Eine experimentelle Bestätigung der theoretischen Erwägungen ergab sich durch die Ergebnisse der Versuchsserie d. Wie geschildert, wurde das Nebennierenmark eines Tieres nach Fixierung in Glutardialdehyd mit dem tissue sectioner in 75µm dicke Gewebsscheiben zerschnitten, und diese Scheiben wurden in essigsaurem kolloidalem Eisen inkubiert. Es erfolgte Einbettung in Paraplast. Die Gewebsscheiben wurden senkrecht zur Längsachse in 6-7µm dicke Schnitte zerlegt. An den Schnitten wurde die Turnbullblaureaktion ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß das Eisen nur unspezifisch an der Oberfläche aggregiert wurde, an keiner Stelle aber in das Innere des Präparates eingedrungen war (Abb. 11).

Diese Beobachtungen wie auch die theoretischen Überlegungen lassen den Schluß zu, daß kolloidale Metalle nicht geeignet sind, intrazelluläre Strukturen darzustellen, vorausgesetzt, daß die Zellmembranen intakt sind. Die Ergebnisse der oben genannten Autoren, denen es gelang, intrazelluläre Strukturen mit Metall zu beladen, können nur so gedeutet wer-

den, daß hier offensichtlich Zellen durch Anschnitte eröffnet wurden und dann das Eisen bzw. Thorium in das Zellinnere eindrang und sich an die sauren Komplexe anlagern konnte.

Die Unmöglichkeit, intrazelluläre CMC mit Eisen oder Thorium darzustellen, ließ die Versuche, Frühstadien der CMC-Aufnahme mit einer spezifisch histochemischen Methode zu verfolgen, negativ ausfallen. Wie bei anderen Gewebekomponenten kommt es aber bei Anwendung von Blei auf den Schnitt zu einer Kontrasterhöhung von CMC, die im Zusammenhang mit anderen morphologischen Befunden exakte Aussagen über die Veränderungen an der Speicherzelle erlauben.

Von JÜRGENSONN (1965) beschreibt, daß die Speicherung des Materials anfangs in feingranulärer, später grobscholliger Form erfolgt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten diese Ergebnisse im wesentlichen bestätigen. 24 Stunden nach einer einmaligen Applikation von CMC befand sich das Material vornehmlich in kleineren Vakuolen, die voneinander isoliert und mit Doppelmembranen umgeben waren. Drei Tage nach der Injektion zeigte sich das beschriebene Bild der konfluierenden Vakuolen, das dann in allen weiteren Stadien vorherrschte. Gleichzeitig fanden sich aber auch Zellen, die mehr oder weniger aus einer einzigen großen Vakuole bestanden, wie sie Abb. 5 zeigt. Es ergibt sich also bei elektronenoptischen Untersuchungen anfangs kleinvakuolige, später durch Konfluenz vieler Einzelvakuolen eine großvakuolige Speicherung.

Diese Bilder sind als die elektronenmikroskopischen Äquivalente der lichtmikroskopisch durch v. JÜRGENSONN (1965) beschriebenen zunächst fein- und später grobscholligen Speicherung zu betrachten. Die genaue Analyse ergibt allerdings im Unterschied zu den Ergebnissen v. JÜRGENSONN's, daß der Übergang der klein- in die großvakuolige Speicherung immer nur für die

Einzelzelle gilt, dieser Prozeß aber nicht synchron in allen Speicherzellen abläuft. Es finden sich daher in jedem Stadium Zellen unterschiedlichen Speicherzustandes. Während die eine Zelle noch kleinvakuolige Speicherung aufweist, hat in einer anderen Zelle die Konfluenz begonnen und ist in einer weiteren vollendet.

Der Grund dafür ist vielleicht darin zu sehen, daß die Energiemenge, die pro Zelle für die Speicherung bereitgestellt werden kann, unterschiedlich groß ist. Diese Vermutung stimmt mit der Beobachtung überein, daß in Zellen mit kleinvakuoliger Speicherung Mitochondrien im allgemeinen noch deutlich nachzuweisen sind, wohingegen sie später nicht mehr in Erscheinung treten. Bei dieser Hypothese wird vorausgesetzt, daß die Mitochondrien als wesentliche Energielieferanten eine entscheidende Rolle bei den Speicherungsvorgängen spielen, wie es auch JANSCO (1955) vermutet.

Es stellt sich nun die Frage, in welchen Zellorganellen die Speicherung stattfindet.

Im vorliegenden Untersuchungsgut war die Mehrzahl der Vakuolen von einer Doppelmembran umgeben, die an der Außenseite in Frühstadien einen eindeutigen Ribosomenbesatz trug (Abb. 10). Dieser Befund wird als Hinweis darauf gedeutet, daß die Speichervakuolen zum überwiegenden Teil als Bildungen des ER aufzufassen sind. Dafür spricht auch die Tatsache, daß in den stark speichernden Zellen kein ER mehr vorhanden ist: es ist gewissermaßen zur Speicherung "verbraucht" worden.

Seit Einführung des Elektronenmikroskops in die Morphologie wird immer wieder die Aufnahme verschiedener Materialien durch Mikropinocytose oder Endocytose beschrieben. Dabei wird das an die Zellmembran gelagerte Material in eine Tasche des Plasmalemms verlagert, die sich dann von der Zelloberfläche abschnürt und als geschlossene Vakuole in das Zellinnere verlegt wird.

Aus den bereits dargelegten methodischen Gründen konnte die Aufnahme der CMC selbst nicht beobachtet werden. Von anderen makromolekularen organischen Verbindungen (NOVELLO und WESSEL 1963; CUCCURULLO 1964) oder anorganischen Stoffen (STAUBESAND 1965; STOCKEM 1967) ist aber bekannt, daß hierbei endocytotische Vorgänge eine Rolle spielen. Dieser Mechanismus wird auch bei der CMC eine Rolle spielen und ein Teil der Vakuolen auf diese Art entstanden sein. Eine Abgrenzung der so entstandenen von anderen Vakuolen soll aus der Art der umgebenden Membranen möglich sein: Von Einzelmembranen umgebene Vakuolen sollen sich von pinocytotischen Vorgängen ableiten (CUCCURULLO 1964). Dieses Argument ist aber nicht unbedingt stichhaltig, denn auch pinocytotisch entstandene Vakuolen können von Doppelmembranen umgeben sein. Wenn somit auch nicht alle Vakuolen als aus dem ER entstanden gedeutet werden dürfen, kann jedoch angenommen werden, daß die Mehrzahl sich davon herleitet.

Es sei in diesem Zusammenhang auch an die lichtmikroskopischen Ergebnisse erinnert. Die Speicherzellen sind ganz und gar mit Speichervakuolen angefüllt (Abb. 3). Eine so große Anzahl von Speichervakuolen spricht eindeutig gegen die Herleitung der Vakuolenmembranen vom Plasmalemm.

Als weitere Organellen, die bei der Speicherung eine Rolle spielen, sind die Mitochondrien zu nennen. Bei der Speicherung von CMC sind Mitochondrien sicherlich nicht in dem Sinne beteiligt, daß in ihnen Speichermaterial konzentriert wird. Die zuweilen in den Mitochondrien nachzuweisende CMC ist offensichtlich aus zerstörten Vakuolen ausgetreten und passiv in die Mitochondrien hinein gelangt, wenn deren Membranen nicht mehr intakt sind (Abb. 6 und 7). In intakten Mitochondrien wurde jedoch keine CMC beobachtet. Eine intramitochondriale Speicherung (OLIVER 1948; ZOLLINGER 1950; CUCCURULLO 1964) wird nach den vorliegenden Ergebnissen für unwahrscheinlich gehalten. Dagegen ist, wie schon erwähnt, anzunehmen, daß die

Mitochondrien funktionell bei der Speicherung mitwirken (JANSCO 1955).

Da die Speicherzellen im elektronenmikroskopischen Bild auffallend zerstört erscheinen, stellt sich die Frage, wie weit die Speichervorgänge physiologischer oder pathologischer Natur sind. Methylcellulose führt bei Ratten zu einer merklichen Stimulierung des Retikulo-histiocytären Systems trotz der Tatsache, daß Methylcellulose in Makrophagen gespeichert wird (BLICKENS und DI LUZIO 1964). Kolloidale Kohle und eine "Lipid-Testemulsion" werden nämlich schneller aus dem Kreislauf entfernt, wenn gleichzeitig Methylcellulose appliziert wird. Das Wachstum von Tumoren ist in mit Methylcellulose behandelten Ratten gehemmt. Die Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu stehen zu den Angaben von GRAUMANN (1957 b), von JÜRGENSONN (1965) und zu den eigenen Ergebnissen, denn hier kam es nach Applikation von CMC zu eindeutigen Zelluntergängen mit Kernpyknosen und schließlich Zellauflösung. Hier ist aber auch die Menge des zugeführten Speichermaterials zu berücksichtigen. Bei der Applikation geringer Mengen des Speicherstoffes kommt es offenbar zu einer Steigerung der Stoffwechselvorgänge in den histiocytären Elementen, nach unphysiologisch hohen Dosen aber zu deren Störung bis zum Zelluntergang. 600-900mg CMC pro kg Körpergewicht gehen offensichtlich über den Bereich des Physiologischen hinaus.

Die Speicherzellen vermögen die CMC aufzunehmen, doch kann die Substanz intrazellulär nicht durch Enzyme abgebaut werden. Dahingehende Beobachtungen wurden schon früher gemacht (NOVELLO und WESSEL 1963; FRAWLEY, WIEBE, KLUG und SHELANSKI 1964). Die Tatsache, daß CMC zwar von der Zelle aufgenommen, aber nicht enzymatisch abgebaut werden kann, erklärt das exzessive Ausmaß der Speicherung und den dann eintretenden Zelltod. Die mit chemisch inerter CMC gefüllten Vakuolen verdrängen die Zellorganellen und blockieren die physiologischen Stoffwechselvorgänge. Nach erfolgtem Zelltod tritt die gespeicherte Substanz wieder aus, um von neuen Speicherzellen aufgenommen zu werden. Es besteht somit ein dauernder Kreislauf mit Aufnahme der CMC in Speicherzellen, Abgabe an die Umgebung durch Zellzerfall und erneute Speicherung. Unterbrochen wird dieser Kreislauf nur dann, wenn aufgrund von Nierenschädigungen, die

Abb. 13 Schematische Darstellung der einzelnen Stadien der Speicherung. Bei (I) wird das Speichermaterial aus dem Zellexternum in Vakuolen des ER aufgenommen. Bei (II) hat eine maximale Auffüllung der Speichervakuolen mit CMC stattgefunden. Erste Degenerationserscheinungen werden sichtbar. Bei (III) geht die Zelle zugrunde. Der pyknotische Kern wird ausgestoßen, das Speichermaterial an die Umgebung abgegeben.

wegen ihrer Molekülgröße normalerweise nicht nierengängige Speichersubstanz renal ausgeschieden wird (CUCCURULLO 1964).

Nierenschädigungen als Folge der CMC-Gabe wurden zuerst von GRAUMANN (1957 a) beobachtet, aber nicht näher beschrieben. Spätere Untersuchungen verglichen die durch CMC hervorgerufene Nephropathie mit den Veränderungen bei menschlicher Präeklampsie (ROWLEY, FITCH, INGER 1962) und bei membranöser Glomerulonephritis (NOVELLO und WESSEL 1963). PARDO und SHAPIRO (1966) sowie CUCCURULLO (1964) benutzen die CMC sogar, um experimentelle Nierenschädigungen zu erzeugen. Bei intakter Organfunktion ist eine Eliminierung der CMC aus dem Organismus nicht möglich.

Diese Tatsache muß die Zahl der Speicherzellen beeinflussen, die in Langzeitversuchen tatsächlich im Verlauf mehrerer Wochen nur geringfügig abnahm (v. JÜRGENSONN 1965). Dieses Ergebnis konnte durch eigene Kontrolluntersuchungen, die sich sogar bis auf einen Zeitraum von sechs Monaten ausdehnten, bestätigt werden. Nach dem oben Gesagten läßt sich diese konstant bleibende Zahl an Speicherzellen ohne Schwierigkeiten erklären. Ob es dadurch zu einer generellen Blockierung des RHS kommt, ist aus diesen Befunden nicht zu entscheiden.

Abb. 13 zeigt in schematischer Darstellung, wie das Speichermaterial aus dem Extrazellularraum in die Vakuolen des ER aufgenommen wird, die zunächst wenig CMC enthalten (I). Mit zunehmender Auffüllung der Zellen zeigen sich erste Degenerationserscheinungen. Der Zellkern fängt an, pyknotisch zu werden und eine beginnende Protrusion wird sichtbar. Die Mitochondrien sind teilweise zerstört. Die Form der Zelle wird zunehmend von der Form der Speichervakuolen bestimmt (II). Im letzten Stadium (III) erkennt man Spiralkörperchen. Die Speichervakuolen sind konfluiert, der pyknotische Zellkern wird ausgestoßen. Die Zelle geht zugrunde, das Speichermaterial wird an die Umgebung abgegeben und von anderen Speicherzellen aufgenommen. Der Kreislauf beginnt von neuem.

Die auffallenden Spiralkörperchen können nicht in jeder Speicherzelle gefunden werden, sondern vornehmlich in stark geschädigten Zellen. Ähnliche Figuren wurden von CAMPICHE (1960) in Alveolarphagocyten der Ratte beschrieben, von BARLAND, NOVIKOFF und HAMERAN (1964) in zur Phagocytose befähigten Zellen der Synovialmembran rheumatischer Patienten und von SUN (1965) in menschlichen Alveolarphagocyten von Patienten mit verschiedenen, vom Autor nicht näher angegebenen Lungenerkrankungen.

SUN (1965) vermutet, daß fein granulierte, osmiophile Substanz sich in den Makrophagen örtlich begrenzt anhäuft und daß dieses Material sich dann zu lamellären Strukturen organisiert. BARLAND, NOVIKOFF und HAMERAN (1964) nehmen an, daß die Gebilde als Areale cytoplasmatischer Degeneration aufgrund physiologischer oder toxischer Reize zu betrachten sind, oder daß sie "break-down-products" phagocytierten Materials darstellen. CAMPICHE (1960) diskutiert, ob es sich um untergehende Mitochondrien oder um Myelinfiguren handelt, die als Entmischungsartefakte entstanden sind.

Nach den eigenen Befunden ist es am wahrscheinlichsten, daß es sich um Entmischungsfiguren der verschiedenen intracytoplasmatischen Membranen handelt. Dafür spricht, daß die Spiralkörperchen vor allem in stark geschädigten Zellen gefunden werden (Abb. 8), in denen keine anderen intracytoplasmatischen Membranen mehr zu finden sind. Der Aufbau der Lamellen aus Doppelt- und Dreifachmembranen (Abb. 9) könnte durch Zusammenlagerung intrazellulärer Membranen, also der Mitochondrien oder des Endoplasmatischen Retikulums erklärt werden. Jedenfalls sind die lamellären Strukturen nicht als charakteristisch für Speicherzellen zu betrachten, sondern als uncharakteristische Zeichen des Zelluntergangs.

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß parenteral applizierte CMC sich sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch in Speicherzellen des Nebennierenmarkes darstellen läßt. Die Aufnahme der CMC

geht mit einer anfänglichen Steigerung der Stoffwechselvorgänge einher, bis diese anabiotischen Vorgänge in Katabiose umschlagen und es zum Untergang der Speicherzellen kommt.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Erwachsenen männlichen und weiblichen Hamstern wurden über einen Zeitraum von 1 Woche täglich 60-90mg Carboxymethylcellulose (CMC) parenteral zugeführt. Die Tiere wurden 24 Stunden, 1 Woche, 2 und 3 Wochen nach der letzten Injektion getötet, das Nebennierenmark gewonnen und nach Fixation in Glutardialdehyd und Refixation in OsO_4 elektronenmikroskopisch untersucht.

2) Der Versuch, CMC elektronenmikroskopisch-histochemisch intrazellulär mit $FeCl_3$, kolloidalem Eisen bzw. Thorium spezifisch nachzuweisen, schlug fehl. Methodische Kontrolluntersuchungen mit eindeutig extrazellulär liegenden Schleimsubstanzen des Rectums zeigten hingegen positive Ergebnisse. Daraus ist abzuleiten, daß Metallsole nicht in Glutardialdehyd-fixiertes Gewebe eindringen können, und daß es daher mit den bisher von verschiedenen Autoren angegebenen Methoden nicht sicher möglich ist, intrazellulär liegende saure Zellbestandteile im Elektronenmikroskop darzustellen. Das kann durch die Tatsache erklärt werden, daß der mittlere Durchmesser der Kolloidteilchen größer

ist als der durchschnittliche Durchmesser der Poren der Zellmembran.

3) Die morphologische Untersuchung ergab, daß in allen Stadien des Versuchszeitraumes eine zelluläre Speicherung von CMC in spezifischen Speicherzellen nachzuweisen war. Die CMC wurde in Vakuolen gespeichert, die als Derivate des Endoplasmatischen Retikulums aufgefaßt werden. Dafür spricht eindeutig der Besatz der Membranen mit Ribosomen. Die CMC selbst weist eine netzartige Struktur auf. Die Vakuolen liegen anfangs isoliert und konfluieren im Laufe des Versuchszeitraumes unter ständiger Aufnahme von CMC miteinander, bis nahezu die gesamte Zelle aus einer einzigen Vakuole besteht. Die Speicherzellen zeigen zunehmend deutlich Degenerationserscheinungen mit Pyknose und Protrusion des Zellkerns. Als Entmischungsfiguren der intracytoplasmatischen Membranen sind häufig charakteristische Spiralkörperchen nachweisbar. Schließlich gehen die Speicherzellen zugrunde und geben das gespeicherte Material an die Umgebung ab. Es wird von neuen Speicherzellen aufgenommen.

Über den Aufnahmemechanismus der CMC in die Speicherzellen kann keine Aussage gemacht werden, da die CMC sich in den frühen Stadien der Speicherung elektronenmikroskopisch nicht darstellt.

LITERATURVERZEICHNIS

BARLAND, P., A.B. NOVIKOFF and D. HAMERAN:

Fine structure and cytochemistry of the rheumatoid synovial membrane, with special reference to lysosomes.

Amer. J. Path. 44, 853-866 (1964)

BENKÖ, S., V. BALÁZS, M. FRÖHLICH, E. HÓRVÁTH, K. KOVÁCS, B. FELKAI und K. RÁK:

Pulmonale Arteriitis und Serumlipoproteinveränderung bei Hunden nach intravenöser Verabreichung von Methylzellulose.

Z. ges. inn. Med. 14, 825-830 (1959)

BERLIN, J.D.:

The localization of acid mucopolysaccharides in the Golgi-complex of intestinal goblet cells.

J. Cell Biol. 32, 760-766 (1967)

BLICKENS, D.A. and N.R. DI LUZIO:

The effect of methylcellulose on the reticuloendothelial system.

J. Reticuloendothel. Soc. 1, 68-76 (1964)

BRICK, I.B.:

Effect of sodium carboxymethylcellulose on the blood cells.

Amer. J. Dig. Dis. 19, 248-250 (1952)

CAMPICHE, M.:

Les inclusions lamellaires des cellules alvéolaires dans le poumon du Raton.

J. Ultrastruct. Res. 3, 302-312 (1960)

CUCCURULLO, L.:

Osservazioni ultrastrutturali intorno alle modificazioni spleniche sperimentalmente indotte da metilcellulosa nel ratto.

Riv. Anat. Pat. 25, 132-149 (1964)

CUCCURULLO, L. e V. COVELLI:

Alterazioni ultrastrutturali da metilcellulosa dell' epatocita e dell' epitelio dei tubuli contorti di ratto.

Riv. Anat. Pat. 25/4, 203-236 (1964)

CURRAN, R.C., A.E. CLARK and D. LOVELL:

Acid mucopolysaccharides in electron microscopy. The use of the colloidal iron method.

J. Anat. 99, 427-434 (1965)

FRAWLEY, J.P., A.K. WIEBE, E.D. KLUG and M.V. SHELANSKI:

Studies on the gastro-intestinal absorption of purified sodium carboxymethylcellulose.

Fd. Cosmet. Toxicol. 2, 539-543 (1964)

GAREAU, R. et G. JASMIN:

Réaction du tissu conjonctif à la carboxyméthylcellulose (CMC).

Laval méd. 37, 547-550 (1966)

GRAUMANN, W.:

Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens.

Z. wiss. Mikrosk. 61, 225-226 (1953)

GRAUMANN, W.:

Beobachtungen über Bildung und Sekretion perjodat-reaktiver Stoffe im Nebennierenmark des Goldhamsters.

Z. Anat. Entwickl. 119, 415-430 (1956 a)

GRAUMANN, W.:

Über Phagocyten in der Nebenniere des Goldhamsters.

Anat. Anz. 103, 83-88 (1956 b) Ergänzgsbd.

GRAUMANN, W.:

Zum Wirkungsmechanismus des Depoteffektes von ACTH-Präparaten.

Klin. Wschr. 34, 1265-1266 (1956 c)

GRAUMANN, W.:

Über die zelluläre Speicherung von Carboxymethylcellulose und Polyphloretinphosphat.

Z. Zellforsch. 46, 430-446 (1957 a)

GRAUMANN, W.:

Weitere Befunde zur interstitiellen Speicherung in der Nebenniere.

Anat. Anz. 104, 354-360 (1957 b) Ergänzgsbd.

GRAUMANN, W.:

Vergleichende Untersuchungen zur Frage der Spezifität verschiedener Modifikationen der Polysaccharid-Eisenreaktion.

Acta histochem. 5, 49-61 (1958)

GRAUMANN, W. und W. CLAUSS:

Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion.

Acta histochem. 6, 1-7 (1958)

GRAUMANN, W. und H.D. GOTHE:

Der cytochemische Nachweis der Trägersubstanz von ACTH-Depotpräparaten.

Acta histochem. 6, 254-262 (1959)

GSTIRNER, F.:

Grundstoffe und Verfahren der Arzneibereitung.

Stuttgart: Enke-Verlag 1960

HEDAYATY, J. and Ch.R. SHUMAN:

Complete obstruction of the esophagus by a weight-reducing tablet.

A.M.A. Arch. Otolaryng. 58, 190-191 (1953)

HOLLEMANN-WIBERG:

Lehrbuch der anorganischen Chemie.

57.-70. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter u. Co 1964

HÓRVÁTH, E., K. KOVÁCS und S. BENKÖ:

Elektive Färbung zum Nachweis der in den Geweben gespeicherten Methylcellulose.

Acta histochem. 3, 273-276 (1957)

HUEPER, W.C.:

Experimental studies in cardiovascular pathology. Thesaurosis and Atheromatosis produced in dogs by the repeated intravenous injection of solutions of sodium cellulose glycollate.

Amer. J. Path. 21, 1021-1029 (1945)

IACOBELLI, A., L. CUCCURULLO, G. ANDREOLI e G. CAPORALE:

Richerche istomorfologiche sulla tesaurismosi splancnica sperimentale condotte in organi di ratti trattati con metilcellulosa per via parenterale.

Riv. Anat. Pat. 24, 929-951 (1963)

JANSCÓ, N.:

Speicherung. Stoffanreicherung im Retikuloendothel und in der Niere.

Akadémiai Kiadó, Budapest, 1955

JUNG, H.P. und G. BRIZIARELLI:

Über das Verhalten eines Gemisches aus Methylcellulose und Carboxymethylcellulose im tierischen Organismus.

Virchows Arch. path. Anat. 326, 1-21 (1954)

JÜRGENSONN v., H.B.:

Speicherung von Carboxymethylcellulose und Polyphloretinphosphat im reticuloendothelialen System des Goldhamsters.

Inaugural-Dissertation, Tübingen (1965)

JÜRGENSONN v., H.B., W. GRAUMANN und D. SASSE:

Weitere Untersuchungen über die zelluläre Speicherung von Karboxymethylze
lulose und Polyphloretinphosphat.

Anat. Anz. 121, 109-115 (1957)

KARNOVSKY, M.J.:

Simple methods for "staining with lead" at high p_H in electron microscopy.

J. biophys. biochem. Cytol. 11/3, 729-732 (1961)

KELLENBERGER, W., W. SCHWAB et A. RYTER:

L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matérial d'in
clusion en ultramicrotomie.

Experientia (Basel), 12, 421-422 (1956)

MACHADO, E., B. BISMARCK, B. LOZZIO and L. VIRGILIO:

Erythrocyte destruction induced by methylcellulose.

Arch. Path. 82, 590-595 (1966)

MILLONING, G.:

Advantages of phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation.

J. appl. Physics 32, 1637 (1961)

MOWRY, R.W.:

The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue G 8 X, and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 402-423 (1963)

NOVELLO, G. und W. WESSEL:

Experimentelle Nierenschädigung durch Cellulosederivate im elektronenmikroskopischen Bild.

Virchows Arch. path. Anat. 336, 278-290 (1963)

OLIVER, J.:

The structure of the metabolic process in the nephron.

J. Mt. Sinai Hosp. 15, 175 (1948)

PARDO, V. and A. P. SHAPIRO:

Ultrastructural glomerular lesions produced by synthetic polysaccharides.

Lab. Invest. 15/3, 617-628 (1966)

REVEL, J.-P.:

A stain for the ultrastructural localization of acid mucopolysaccharides.

J. Mikroskopie 3, 535-544 (1964)

REVEL, J.-P.:

Staining of polysaccharids in ultrathin sections.

J. Histochem. Cytochem. 14, 740-741 (1966)

ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik.

15. Aufl. München: R. Oldenburg 1948

RÖMPP, H.:

Chemie Lexikon.

4. Aufl. Stuttgart: Franck' sche Verlagshandlung 1966

ROWLEY, D.A., F.W. FITCH and J.B. INGER:

Anemia produced in the rat by methylcellulose.

Arch. Path. 74, 331-339 (1962)

SABATINI, D.D., K. BENSCH and R.J. BARRNETT:

Cytochemistry and electron microscopy.

J. Cell Biol. 17, 19-58 (1963)

SELYE, H.:

Changes in adrenal medulla following treatment with an ACTH-preparation containing carboxymethylcellulose.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 90, 670-672 (1955)

SUN, C.N.:

Peculiar particles in macrophage cells of the interstitium of diseased human lungs.

J. Ultrastruct. Res. 12, 447-451 (1965)

SCHNABEL, R.:

Zum histologischen Nachweis des Viskositätsträgers (Carboxymethylcellulo im wässrigen Kontrastmittel.

Acta histochem. 8, 50-59 (1959)

STAUBESAND, J.:

"Cytopempsis" in Sekretion und Exkretion, 2. wiss. Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte.

Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1965

STEHBENS, W.E., D. PHIL and M.D. SILVER:

Arterial lesions induced by Methyl Cellulose.

Amer. J. Path. 48, 483-503 (1966)

STOCKEM, W.:

Die Eignung von Aerosil für die Untersuchung endocytotischer (pinocytotischer) Vorgänge.

Mikroskopie 22, 143-147 (1967)

TEOH, T.B.:

The effects of methylcellulose in rats with special reference to splenomegaly, anaemia, and the problem of hypersplenism.

J. Path. Bact. 81, 33-44 (1961)

VANINO, L.:

Präparative Chemie, I. Band

Stuttgart: Enke-Verlag 1921

WELSH, R.C.:

Methyl Cellulose in ophthalmology.

Sth. med. J. 46, 819-820 (1953)

WETZEL, M.G., B.K. WETZEL and S.S. SPICER:

Ultrastructural localization of acid mucosubstances in the mouse colon with iron-containing stains.

J. Cell Biol. 30, 299-315 (1966)

WILJASALO, M. and P. RISSANEN:

A new double-contrast method in esophageal roentgenology.

Ann. Med. intern. Fenn. 55, 77-80 (1966)

YARDLEY, J. H. and G. D. BROWN:

Fibroblasts in tissue culture. Use of colloidal iron for ultrastructural localization of acid mucopolysaccharides.

Lab. Invest. 14/5, 501-513 (1965)

ZOLLINGER, H. U.:

Les mitochondries.

Rev. Hémat. 5, 696 (1950)

Herrn Professor Dr. W. Graumann und Herrn Privatdozent Dr. M. Arnold danke ich für die Anregung des Themas, die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchung sowie für die günstigen Arbeitsbedingungen.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Anatomischen Institutes, besonders Fräulein M. Tölken und Herrn H. Guckes für ihre technische Hilfe vor allem am Elektronenmikroskop.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

LEBENSLAUF

Am 30. August 1941 wurde ich, Horst Eisold, als Sohn des Kaufmanns Georg Eisold und seiner Ehefrau Hedwig in Arnsberg geboren.

Von 1947 bis 1953 besuchte ich die Grundschule, zunächst in Westfalen, später in Hamburg. Daran schloß sich der Besuch eines Gymnasiums an, das ich 1960 verließ, um eine Lehre als Buchdrucker zu beginnen. 1962 schloß ich die Lehre mit der Gehilfenprüfung vor der Handelskammer Hamburg ab. Während der Lehrzeit bereitete ich mich auf die Reifeprüfung vor, die ich 1963 in Buxtehude ablegte. Nach einem weiteren Jahr, anfangs als Buchdrucker in Hamburg, dann als Buchhändler in London, begann ich im Sommersemester 1964 in Tübingen das Studium der Medizin.

1965 legte ich in Tübingen die naturwissenschaftliche, 1966 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem Semester in Wien kehrte ich an die Eberhard-Karls-Universität zurück.

Im Februar 1970 legte ich dort das medizinische Staatsexamen ab.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681